



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 39/00, 39/385, 48/00, A61P 35/00 // C07K 14/26	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/48629
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00394 (22) Date de dépôt international: 17 février 2000 (17.02.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/01917 17 février 1999 (17.02.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): RENNO, Toufic [LB/FR]; Les Coulerins B1, F-74580 Viry (FR). ROMERO, Pedro [CO/CH]; chemin du Polny 1, CH-1066 Epalinges (CH). MICONNET, Isabelle [FR/CH]; chemin de Chandolin 5, CH-1005 Lausanne (CH). CAROTTINI, Jean-Charles [CH/CH]; avenue du Léman 12, CH-1025 Saint-Suplice (CH). BONNEFOY, Jean-Yves [FR/FR]; Les Noyers, F-74350 Le Sappey (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, BR, CA, CN, JP, MX, US, ZA, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requies.</i>
(54) Title: USE OF AN OmpA ENTEROBACTERIUM PROTEIN ASSOCIATED WITH THE ELAGIGILTV PEPTIDE FOR TREATING MELANOMAS		
(54) Titre: UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE ASSOCIEE AU PEPTIDE ELAGIGILTV POUR LE TRAITEMENT DES MELANOMES		
(57) Abstract		
<p>The invention concerns the use of an enterobacterium membrane protein OmpA, in particular of <i>Klebsiella pneumoniae</i>, associated with an antigen or a hapten for preparing a pharmaceutical composition designed to generate or enhance a cytotoxic T response directed against a tumor cell. The invention also concerns the use of said compounds for preventing or treating infection or cancer, in particular cancers associated with a tumoral antigen such as melanoma, and pharmaceutical compositions comprising some of said compounds.</p>		
(57) Abrégé		
<p>L'invention concerne l'utilisation d'une protéine de membrane OmpA d'entérobactérie, notamment de <i>Klebsiella pneumoniae</i>, associée à un antigène ou un haptène pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou accroître une réponse T cytotoxique dirigée contre une cellule tumorale. L'invention comprend l'utilisation de ces composés pour la prévention et le traitement d'infection ou de cancer, notamment les cancers associés à un antigène tumoral tels que le mélanome, ainsi que des compositions pharmaceutiques comprenant certains de ces composés.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE ASSOCIEE AU PEPTIDE ELAGIGILTV POUR LE TRAITEMENT DES MELANOMES

L'invention concerne l'utilisation d'une protéine de membrane OmpA
5 d'entérobactérie, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, associée à un antigène ou un haptène pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou accroître une réponse T cytotoxique dirigée contre un agent infectieux ou une cellule tumorale. L'invention comprend l'utilisation de ces composés pour la prévention et le
10 traitement d'infection ou du cancer, notamment les cancers associés à un antigène tumoral tels que les mélanomes, ainsi que des compositions pharmaceutiques comprenant certains de ces composés.

La vaccination est un moyen efficace de prévenir ou de réduire les infections virales ou bactériennes. Le succès des campagnes de vaccination dans ces domaines a permis d'étendre le concept de vaccin jusqu'alors utilisé dans le domaine de
15 l'infectiologie aux domaines du cancer et des maladies auto-immunes. Les antigènes vaccinaux administrés seuls chez l'hôte ne sont souvent pas assez immunogéniques pour induire une réponse immunitaire, et doivent donc être associés à un adjuvant ou couplés à une protéine porteuse pour induire (ou augmenter) leur immunogénicité. Dans ces conditions, seule une réponse immune de type humorale peut être induite.
20 Or, dans le cadre d'une thérapie antivirale, la génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) capables de reconnaître et de détruire le virus est de toute importance (Bachmann et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24, 2228-2236 ; Borrow P., 1997, J. Virol. Hepat., 4, 16-24), comme l'attestent de nombreuses études montrant, *in vivo*, le rôle protecteur des réponses dirigées contre les épitopes viraux (Arvin AM,
25 1992, J. Inf. Dis., 166, S35-S41 ; Koszinowski et al., 1987 Immunol. Lett., 16, 185-192).

L'importance des réponses CTL a aussi été fortement documentée dans les réponses antitumorales notamment celles dirigées contre les cellules de mélanome (revue dans Rivoltini et al., 1998, Crit. Rev. Immunol. 18, 55-63). Le ou les épitopes
30 CTL (séquences peptidiques interagissant avec les molécules de classe I et présentés aux lymphocytes T CD8+) ont été définis pour plusieurs antigènes.

Cependant, la difficulté réside dans la génération de CTL *in vivo*, due à la faible immunogénicité de ces peptides (Melief, 1992, Adv. Cancer Res., 58, 143-175 ; Nandaz et Sercarz, 1995, Cell, 82, 13-17).

Des recherches s'orientent par conséquent vers l'identification de nouveaux
5 adjuvants, ou de système de délivrance d'antigènes («delivery system»), permettant d'induire des CTL. Grâce à leur efficacité à présenter les antigènes et à stimuler le système immunitaire, les cellules dendritiques, par exemple, ont été utilisées pour générer des réponses CTL antivirales (Ludewig B et al., 1998, J. Virol., 72, 3812-3818 ; Brossard P. et al., 1997, J. Immunol., 158, 3270-3276) ou anticancéreuses
10 (Nestle F.O. et al., 1998, Nat. Med., 4, 328-332). Les approches ont consisté à charger les cellules dendritiques *ex vivo* avec l'antigène d'intérêt (peptides ou lysat cellulaire) et réimplanter ces cellules chez le patient. D'autres approches consistent à transfecter *ex vivo* les cellules dendritiques avec le gène codant pour l'antigène d'intérêt et à réinjecter ces cellules transfectées (Gilboa E. et al., 1998, Cancer
15 Immunol. Immunother., 46, 82-87). Ces approches ont été utilisées avec succès chez la souris et récemment chez l'homme (Hsu F.J. et al., 1996, Nat. Med., 2, 52-58) mais restent néanmoins complexes dans la mesure où ces cellules doivent être traitées *ex vivo* (transformation des cellules ou internalisation des antigènes) et transplantées dans l'organisme hôte. De même, l'utilisation de particules de type viral (Layton G.T.
20 et al., 1993, J. Immunol., 151, 1097-1107) ou de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) (Valmori et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24, 1458-1462) permet de générer des réponses CTL. Toutefois, une vaccination antivirale ou antitumorale réalisée avec des peptides correspondant à des épitopes CTL et en présence d'un tel adjuvant peuvent conduire à un état de tolérance spécifique qui peut conduire dans certains cas à l'effet
25 contraire recherché, c'est-à-dire à une diminution de la réponse immune (Toes et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 7855-7860).

Ainsi, il existe aujourd'hui un grand besoin de disposer d'un composé qui, associé à une molécule, notamment un antigène ou haptène, soit capable de générer des CTL dirigés contre ladite molécule. Un tel composé pourrait en particulier être
30 utilisé pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à induire une

protection immunitaire de type CTL antiviral, antibactérien, antifongique ou antiparasitaire, ou antitumoral.

De manière surprenante, il a été mis en évidence qu'une protéine de la membrane externe de bactérie à gram négatif, notamment une protéine OmpA d'entérobactérie telle que la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* (protéine décrite dans WO 95/27787 et WO 96/14415), a la propriété d'éluciter une réponse CTL contre une molécule qui lui est associée de manière covalente ou non, de préférence sans recours à l'addition d'un autre adjuvant.

Ainsi, la présente invention est relative à l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, d'un de ses fragments ou d'une séquence nucléique codant pour ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou à accroître une réponse T cytotoxique contre un agent infectieux ou une cellule tumorale, *in vitro* ou *in vivo*, de préférence *in vivo*, ainsi que pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou à accroître ladite réponse T cytotoxique.

Dans la présente invention, on entendra désigner par le terme « protéine » également les peptides ou les polypeptides et par le terme « OmpA » (pour « Outer Membrane Protéin »), les protéines de la membrane externe de type A.

Par fragment d'une protéine OmpA, on entend désigner en particulier tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la séquence d'acides aminés de la protéine OmpA qui, lorsqu'il est associé à un antigène ou haptène spécifique d'un agent infectieux ou d'une cellule tumorale, est capable de générer ou accroître une réponse T cytotoxique dirigée contre ledit agent infectieux ou ladite cellule tumorale, ledit fragment de la protéine OmpA comprenant au moins 5 acides aminés, de préférence au moins 10 acides aminés ou de manière plus préférée au moins 15 acides aminés.

Par « antigène ou haptène spécifique d'un agent infectieux ou d'une cellule tumorale », on entend désigner en particulier tout composé exprimé par un agent infectieux, tel qu'un virus, une bactérie, une levure, un champignon ou un parasite, par une cellule tumorale, ou un de leurs analogues structuraux, qui seul ou en

association avec un adjuvant de l'immunité est capable d'induire une réponse immunitaire spécifique dudit agent infectieux ou de ladite cellule tumorale.

Par analogue d'un antigène ou haptène, on entend désigner en particulier dans la présente description un composé présentant une analogie structurale avec ledit
5 antigène ou haptène capable d'induire une réponse immunologique dirigée contre ledit antigène ou haptène dans un organisme préalablement immunisé avec ledit composé analogue.

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre, associée à ladite
10 protéine OmpA d'entérobactérie, un antigène ou un haptène spécifique dudit agent infectieux ou de ladite cellule tumorale.

De préférence, l'invention comprend l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit agent infectieux est une particule virale, une bactérie, une levure, un champignon ou un parasite.

15 Dans un mode de réalisation particulier, l'invention comprend l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie.

20 Les procédés d'extraction de protéines de membrane bactériennes sont connus de l'homme de l'art et ne seront pas développés dans la présente description. On peut citer par exemple, mais sans s'y limiter le procédé d'extraction décrit par Haeuw J.H. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Dans un autre mode de réalisation préféré, l'invention comprend également
25 l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

Les méthodes de préparation de protéines recombinantes sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description,
30 on pourra néanmoins se référer à la méthode décrite dans les exemples. Parmi les cellules utilisables pour la production de ces protéines recombinantes, il faut citer bien

entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in *E. coli*. Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifère (Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4:558-563) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre par exemple des baculovirus (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4:564-572).

De manière tout à fait préférée, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

En particulier, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae*, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 %, de préférence 90 % et 95 %, après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a).

Par séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés présentant une homologie d'au moins 80 % après alignement optimal avec une séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés déterminée, on entend désigner une séquence qui après alignement optimal avec ladite séquence déterminée comprend un pourcentage d'identité d'au moins 80 % avec ladite séquence déterminée.

Par «pourcentage d'identité» entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur

toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par «fenêtre de comparaison» pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale par fenêtre de comparaison dans laquelle la région de la séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, «BLAST 2 sequences», disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, les paramètres utilisés étant ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres «open gap penalty» : 5, et «extension gap penalty» : 2 ; la matrice choisie étant par exemple la matrice «BLOSUM 62» proposée par le programme), le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer étant calculé directement par le programme.

Parmi lesdites séquences présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence OmpA de référence, on préfère les séquences de, ou codant pour des,

peptides capables d'induire une activité CTL dirigée spécifiquement contre l'antigène ou haptène qui lui est associée, telle que l'activité CTL mesurée au moyen des techniques standards décrites dans les exemples ci-après.

L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est choisi parmi les protéines, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides ou tout composé capable de diriger spécifiquement la réponse CTL contre ledit agent infectieux ou ladite cellule tumorale.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé ou mélangé avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé par liaison covalente, notamment par couplage chimique, avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

Dans un mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit antigène ou haptène pour faciliter le couplage chimique, de préférence, ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

Selon l'invention, il est possible d'introduire un ou plusieurs éléments de liaison, notamment des acides aminés pour faciliter les réactions de couplage entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit antigène ou haptène. Le couplage covalent entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit antigène ou haptène selon l'invention peuvent être réalisés à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments. Les réactifs bifonctionnels permettant ce couplage seront déterminés en fonction de l'extrémité de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, choisie pour effectuer le couplage et de la nature dudit antigène ou haptène à coupler.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que le couplage entre ledit antigène ou haptène et ladite protéine

OmpA, ou l'un de ses fragments, est réalisé par recombinaison génétique, lorsque ledit antigène ou haptène est de nature peptidique.

Les conjugués issus d'un couplage à ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, peuvent être préparés par recombinaison génétique. La protéine chimérique
5 ou hybride (conjugué) peut être produite par des techniques d'ADN recombinant par insertion ou addition à la séquence d'ADN codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, d'une séquence codant pour ledit antigène ou haptène de nature protéique.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes
10 utilisées en génie génétique pour construire des polynucléotides hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par D.V. Goeddel (Gene expression technology, Methods in Enzymology, vol. 185, 3-187, 1990).

15 Sous un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride, ou comprend un vecteur contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride ou une cellule hôte transformée contenant ladite construction nucléique capable d'exprimer ladite protéine
20 hybride.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à éliminer les agents infectieux ou à inhiber la croissance de tumeurs.

De préférence, l'utilisation selon l'invention est relative à la préparation d'une
25 composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les maladies infectieuses ou les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral.

Parmi les cancers dont les tumeurs expriment un antigène tumoral associé pouvant être prévenus ou traités par les utilisations selon la présente invention, on peut citer en particulier, mais sans s'y limiter :

- 30 o le cancer du sein, du poumon, du colon, et le carcinome gastrique (Kawashima et al., 1999, Cancer Res. 59:431-5) ;

- le mésothéliome, l'ostéosarcome, les cancers du cerveau (Xie et al., 1999, J. Natl. Cancer. Inst. 91:169-75) ;
- le mélanome (Zheuten et al., 1998, Bratisl. Lek. Listy 99:426-34) ;
- l'adénome cystique du pancréas (Hammel et al., 1998, Eur. J. gastroenterol. Hepatol. 10:345-8) ;
- le cancer colorectal (Ogura et al., 1998, Anticancer Res. 18:3669-75) ;
- le carcinome des cellules rénales (Jantzer et al., 1998, Cancer Res. 58:3078-86) ;
et
- le cancer de l'ovaire et du cervix (Sonoda et al., 1996, Cancer. 77:1501-9).

10 L'invention a en particulier pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse, notamment d'origine virale, bactérienne ou fongique, ou parasitaire, ou un cancer, de préférence associé à un antigène tumoral, en particulier les mélanomes.

15 L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité, notamment sous la forme d'un liposome.

20 De préférence, l'invention comprend l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit véhicule est un vecteur viral contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride, ou une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride.

25 L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite construction nucléique, ou la construction nucléique contenue dans ledit vecteur ou ladite cellule hôte transformée, comprend une séquence nucléique choisie parmi la séquence SEQ ID N° 1, l'un de ses fragments présentant au moins 15 nucléotides, de préférence 30 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N° 1, ou
30 une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % après alignement optimal avec l'une desdites séquences.

De préférence, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, ou d'un de ses fragments, associée à un antigène ou un haptén pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer une réponse T cytotoxique dirigée contre une cellule tumorale selon la présente invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptén est le peptide de séquence SEQ ID
5 N° 3 : ELAGIGILTV et en ce que la réponse T cytotoxique est dirigée contre des cellules de mélanome.

De préférence également, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, ou d'un de ses fragments, associée au peptide de
10 séquence ELAGIGILTV selon la présente invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des mélanomes malins.

Sous un autre aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique telle que définie précédemment, en particulier :

- 15 - une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, associée par mélange ou par couplage covalent au peptide de séquence ELAGIGILTV ; ou
- une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une construction nucléique contenant un acide nucléique codant pour une protéine OmpA
20 d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, et un acide nucléique codant pour le peptide de séquence ELAGIGILTV.

Comme défini précédemment pour l'utilisation selon l'invention, ladite composition pharmaceutique selon l'invention pourra comprendre par exemple une protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, couplée par liaison
25 covalente au peptide de séquence ELAGIGILTV par synthèse chimique, à partir d'OmpA recombinante ou obtenue par un procédé d'extraction, ou couplée par recombinaison génétique.

Comme défini également précédemment pour l'utilisation selon l'invention, ladite composition pharmaceutique selon l'invention pourra comprendre par exemple
30 un vecteur comprenant une construction nucléique contenant un acide nucléique codant pour une protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, et/ou un acide

nucléique codant pour le peptide de séquence ELAGIGILTV, ou encore une cellule transformée capable d'exprimer une protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, et/ou le peptide de séquence ELAGIGILTV.

5 L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend la protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, une protéine dont la séquence présente une homologie d'au moins 80 % après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2 ou un fragment d'au moins 5 acides aminés de ladite protéine OmpA de séquence SEQ ID N° 2, associée par mélange ou par couplage au peptide de séquence ELAGIGILTV.

10 La présente invention a en outre pour objet une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une construction nucléique contenant un acide nucléique codant pour la protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, une protéine dont la séquence présente une homologie d'au moins 80 % après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2 ou un fragment d'au moins 5
15 acides aminés de ladite protéine OmpA de séquence SEQ ID N° 2, et un acide nucléique codant pour le peptide de séquence ELAGIGILTV.

Selon la présente invention, lesdites compositions seront véhiculées sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité, telle que sous la forme d'un liposome, ou d'un vecteur viral ou d'une cellule hôte transformée capable
20 d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit peptide de séquence ELAGIGILTV.

Selon la présente invention, lesdites compositions seront de préférence contenues dans un milieu pharmaceutiquement acceptable.

Au sens de la présente invention, le milieu pharmaceutiquement acceptable est
25 le milieu dans lequel les composés de l'invention sont administrés, préférentiellement un milieu injectable chez l'homme. Il peut être constitué d'eau, d'une solution aqueuse saline ou d'une solution aqueuse à base de dextrose et/ou de glycérol.

Selon la présente invention, lesdites compositions pourront contenir en outre un détergent.

30 Les compositions selon l'invention peuvent contenir en outre un détergent, et notamment tout type de tensioactif pharmaceutiquement acceptable, comme par

exemple des tensioactifs anioniques, cationiques, non-ioniques ou amphotères. On utilise préférentiellement les détergents Zwittergent 3-12 et l'octylglucopyranoside et encore plus préférentiellement le Zwittergent 3-14.

L'invention comprend également les compositions selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles ne contiennent aucun autre adjuvant permettant d'induire une réponse CTL.

De manière préférée, ladite composition pharmaceutique selon l'invention ne contient pas d'adjuvant de l'immunité, en dehors de la protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, ou d'un acide nucléique codant pour la protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, caractéristique des compositions pharmaceutiques de l'invention.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

Figures 1A, 1B, 1C et 1D : Mesure de l'activité CTL anti-MELAN-A et anti-TRP-2 de cellules effectrices.

Après immunisation avec 50 μ g hELA mélangé avec 3 μ g rP40 (figure 1A), 50 μ g hELA mélangé avec 300 μ g rP40 (figure 1B), 50 μ g hELA couplé à rP40 (figure 1C), ou 50 μ g du peptide TRP-2 mélangé avec 300 μ g rP40 (figure 1D), les cellules de ganglions drainants sont stimulées avec des cellules EL-4 A2/Kb (figures 1A, 1B, 1C) ou EL-4 (figure 1D) irradiées et pré-pulsées avec 1 μ M du peptide relevant avant d'être évaluées pour leur capacité à tuer des cellules cibles pré-pulsées (rectangle) ou non (losange) avec le peptide relevant.

Les abscisses des repères des figures 1A à 1D correspondent au rapport des cellules T effectrices (lymphocytes activés) mises en présence sur les cellules cibles (EL-4 A2/Kb ou EL-4).

Figures 2A, 2B, 2C et 2D : Mesure de l'activité CTL anti-MELAN-A de cellules effectrices en présence de la protéine rP40 comparée à l'activité CTL obtenue avec un protocole standard d'immunisation.

Après immunisation avec hELA (50 μ g) seul (ELA, Figure 2A), hELA mélangé à 300 μ g rP40 (ELA + P40, Figure 2B), hELA couplé à 300 μ g rP40 (ELA/P40,

Figure 2C) ou hELA mélangé avec 50 μ g de peptide P30 adjuvé avec IFA (ELA + IFA + TT, Figure 2D) (IFA pour Adjuvant Incomplet de Freund et TT pour Tetanus Toxoïd), les cellules de ganglions drainants sont stimulées deux semaines in vitro avec des cellules EL-4 A2/Kb irradiées et pré-pulsées avec 1 μ M du peptide relevant avant
5 d'être évaluées pour leur capacité à tuer des cellules cibles EL-4 A2/Kb pré-pulsées (rectangle) ou non (losange) avec le peptide hELA.

Exemple 1 : Clonage du gène codant pour la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*

Le gène codant pour la protéine P40 a été obtenu par amplification par PCR à
10 partir de l'ADN génomique de *Klebsiella pneumoniae* IP I145 (Nguyen et col., Gene, 1998). Le fragment de gène codant de ce gène est inséré dans divers vecteurs d'expression sous contrôle de différents promoteurs, en particulier celui de l'opéron Trp. La séquence nucléotidique et la séquence peptidique de la protéine P40 sont représentées par les séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 ci-après. Une souche
15 productrice *E. coli* K12, a été transformée par un vecteur d'expression pvaLP40. La protéine recombinante P40 (dénommée rP40) est produite sous forme de corps d'inclusion avec un rendement important (> 10 % en g de protéines/g de biomasse sèche).

Cet exemple n'est qu'une illustration de l'expression de la protéine rP40, celle-
20 ci pouvant être étendue à d'autres souches bactériennes ainsi qu'à d'autres vecteurs d'expression.

Exemple 2 : Procédé de fermentation de protéines de fusion rP40

Dans un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) renfermant de l'Ampicilline (100 μ g/ml, Sigma) et de la Tétracycline (8 μ g/ml,
25 Sigma) on inocule avec la souche *E. coli* transformée décrite ci-dessus. On incube pendant une nuit à 37°C puis, 200 ml de cette culture sont utilisés pour ensemercer 2 litres de milieu de culture dans un fermenteur (Biolafitte, France). De manière assez classique, le milieu de culture peut être composé d'agents chimiques, supplémentés par les vitamines, des extraits de levure, connus pour favoriser une croissance de
30 cellules bactériennes à densité élevée.

Les paramètres contrôlés durant la fermentation sont : le pH, l'agitation, la température, le taux d'oxygénation, l'alimentation de sources combinées (glycérol ou glucose). De manière générale, le pH est régulé à 7,0, la température est fixée à 37°C. La croissance est contrôlée en alimentant en glycérol (87 %) à un débit constant (12 ml/h) pour maintenir le signal de tension de l'oxygène dissous à 30 %. Lorsque la turbidité de la culture (mesurée à 580 nm) atteint la valeur de 80 (après environ 24 heures de culture), la production des protéines est déclenchée par addition de l'acide indole acrylique (IAA) à la concentration finale de 25 mg/l. Environ 4 heures après induction, les cellules sont récoltées par centrifugation. La quantité de biomasse humide obtenue est d'environ 200 g.

Exemple 3 : Procédé d'extraction et de purification de la protéine rP40

Extraction de la rP40

Après centrifugation du bouillon de culture (4000 rpm, 10 min, 4°C), les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5. Les insolubles, ou corps d'inclusion, sont obtenus après un traitement par le lysozyme (0,5 g/litre, 1 heure à température ambiante sous agitation douce). Le culot de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (15 min à 10 000 g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl, 25 mM à pH 8,5 et 5 mM MgCl₂ puis centrifugé (15 min à 10 000 g).

On solubilise les corps d'inclusion à 37°C pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5 contenant 7 M urée (agent dénaturant) et 10 mM de dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation (15 min à 10 000g) permet d'éliminer les particules non solubles.

On resuspend ensuite dans 13 X volumes de tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5 contenant du NaCl (8,76 g/l) et du Zwittergent 3-14 (0,1 %, p/v). La solution est laissée pendant une nuit à température ambiante sous agitation douce au contact de l'air (favoriser la renaturation de la protéine par dilution et réoxydation des ponts disulfures).

Purification de la protéine rP40

- Etape de chromatographie d'échange d'anions.

Après une nouvelle centrifugation, la solution est dialysée contre un tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 (100 X volumes de tampon) pendant une nuit à 4°C.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (gel Biorad Macro Prop High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus, à un débit linéaire de 15 cm/h. Les protéines sont détectées à 280 nm. La protéine rP40 est éluée, avec un débit linéaire de 60 cm/h, pour une concentration de 0,2 M en NaCl dans le tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,5 : 0,1 % Zwittergent 3-14.

- Etape de chromatographie d'échange de cations.

Les fractions contenant la protéine rP40 sont poolées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de cellule à agitation Amicon utilisé avec une membrane Diaflo de type YM10 (seuil de coupure 10 kDa) pour des volumes de l'ordre de 100 ml, ou à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa pour des volumes supérieurs. La fraction ainsi concentrée est dialysée pendant une nuit à 4°C contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (gel Biorad Macro Prep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM, pH 3,0, à 0,1% de Zwittergent 3-14. La protéine rP40 est éluée (vitesse 61 cm/h) pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les profils électrophorétiques montrent un degré de pureté de l'ordre de 95 %. L'état de la protéine est suivi par SDS-PAGE. Selon sa forme dénaturée ou native, la protéine P40, extraite de la membrane de *Klebsiella pneumoniae*, possède un comportement électrophorétique (migration) caractéristique. La forme native (structure en feuillets β) présente en effet une masse moléculaire plus faible que la forme dénaturée (structure en hélices α) sous l'action d'un agent dénaturant, tel que l'urée ou le chlorhydrate de guanidine, ou par chauffage à 100°C en présence de SDS. La protéine rP40 n'est pas correctement renaturée en fin de renaturation, que celle-ci soit réalisée en absence ou en présence de 0,1 % ; (p/v) Zwittergent 3-14. En revanche, une renaturation totale est obtenue après dialyse contre un tampon Tris/HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % (p/v) Zwittergent 3-14. Toutefois, il faut noter que cette renaturation n'est obtenue que

lorsque l'étape de dilution et le traitement à température ambiante sont réalisés eux-mêmes en présence de Zwittergent 3-14 (résultats négatifs en absence de détergent).

Exemple 4 : Génération de CTL

Les réponses CTL antitumorales dirigées contre les cellules de mélanome ont
5 été définies pour plusieurs antigènes. Ces antigènes sont compris dans l'une de trois catégories :

a) les antigènes de rejet spécifiques du mélanome, tels que ceux de la famille des MAGE (revu par van der Bruggen et al., Science 254:1643) ;

b) les antigènes résultant de la mutation de protéines normales. Ce groupe
10 inclut MUM-1 (Coulie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7976-7980 (1995) ; CDK4 (Wolfel et al., Science 296:1281-1284 (1995) et HLA-A2 (Brandel et al., J. Exp. Med. 183 :2501-2508 (1996) ;

c) les antigènes de différenciation, exprimés par les mélanomes et les
mélanocytes. Ce groupe inclut la tyrosinase (Wolfel et al., Eur J. Immunol. 4:759
15 (1994) et Brichard et al., Eur. J. Immunol. 26:224 (1996)) ; gp 100 (Kang et al., J. Immunol. 155:1343 (1995), Cox et al., Science 264:716 (1994), et Kawakami et al., J. Immunol. 155:3961 (1995)) ; gp75 (Wang et al., J. Exp. Med. 183:1131 (1996)), et Mart-1/MelanA (voir brevet US 5,620,886).

De tous ces antigènes, Mart-1/MelanA apparaît comme le meilleur candidat
20 dans une utilisation en immunothérapie, et ce pour plusieurs raisons. D'abord, cet antigène a été identifié à partir de la réponse CTL in vivo des lymphocytes infiltrant le mélanome et non celle, in vitro, des cellules du sang périphérique, ce qui suggérerait une plus grande pertinence de cet antigène dans la réponse naturelle in vivo contre le mélanome (Kawakami et al., J. Exp. Med. 180:347 (1994)). De plus, Mart-1/MelanA
25 est exprimé sur tous les mélanomes examinés, ce qui en fait une cible privilégiée d'une intervention immunothérapique. Enfin, des peptides dérivés de Mart-1/MelanA sont capables d'induire une réponse CTL spécifique chez les patients du mélanome exprimant l'antigène d'histocompatibilité HLA-A2 (Rivoltini et al., J. Immunol. 154:2257 (1995) ; Valmori et al. J. Immunol. 160:1750 (1998)).

30 HLA-A2 est l'allèle le plus fréquemment exprimé chez les Caucasiens. Les épitopes CTL de Mart-1/MelanA ont été définis pour cet allèle. Le peptide

antigénique reconnu par la majorité des lignées CTL humaines comprend les acides aminés 27-35 AAGIGILTV (Kawakami et al., J. Exp. Med. 180:347 (1994)). D'autre part, des études sur l'affinité de la liaison avec HLA-A*0201 et la reconnaissance par des clones CTL ont démontré que le peptide optimal pour ces deux fonctions est le
5 décapeptide 26-35 EAAGIGILTV (Romero et al., J. Immunol. 159:2366 (1997)). Cependant, il apparaît que ces peptides sont faiblement immunogéniques in vitro (Valmori et al., J. Immunol. 160:1750 (1998)) et in vivo (Jaeger et al., Int. J. Cancer 66:162 (1996)).

En comparant la séquence des acides aminés des épitopes T de Mart-1/MelanA
10 avec les motifs peptidiques de A*0201 (Rammensee et al., Immunogenetics 41:178 (1995)), il apparaît que les peptides 26-35 et 27-35 ont des résidus d'ancrage non dominants à la position 2 et lient donc faiblement la molécule HLA-A*0201 (Kawakami et al., J. Immunol. 154:3961 (1995)), ce qui pourrait expliquer leur faible immunogénicité. La demande internationale de brevet publiée sous le numéro WO
15 98/58951 décrit un analogue au peptide 26-35 où l'Alanine en position 2 a été remplacée par une Leucine (séquence que l'on appellera ELA).

Le peptide hELA, utilisé dans les expériences ci-dessous, est l'objet de la demande de brevet WO 98/58951 propriété de l'Institut Ludwig de Recherche sur le Cancer. hELA est un analogue du décapeptide 26-35 (EAAGIGILTV) de Melan-
20 A/MART-1, une protéine exprimée sur les mélanocytes et les mélanomes. Bien que le décapeptide 26-35 de Melan-A/MART-1 soit capable de se lier à la molécule HLA-A0201 (Romero et al., 1997, J. Immunol. 159, 2366-2374), il est faiblement immunogène in vitro et in vivo (Valmori et al., 1998, J. Immunol. 160, 1750-1758). L'analogue hELA a été généré par la substitution du second acide aminé du
25 décapeptide 26-35 de Melan-A/MART-1 (une alanine) par une leucine. Le résultat de cette substitution, qui est basée sur une analyse des résidus nécessaire à l'ancrage des peptides à la molécule HLA-A0201, est une reconnaissance plus efficace par les CTL de patients de mélanome et une meilleure immunogénicité in vitro (Valmori et al., 1998, J. Immunol. 160, 1750-1758). Des souris transgéniques HLA-A* 0201/Kb
30 (A2/Kb) de souche C57Bl/6 x BDA/2 (Vitiello et al., 1991, J. Exp. Med., 173, 1007-1015) ont été utilisées dans cette étude pour tester ELA. La molécule MHC de classe I

exprimée chez ces souris est une molécule chimérique formée des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule humaine HLA-A0201 (allotype le plus fréquemment retrouvé) et du domaine $\alpha 3$ de la molécule murine K^b.

Le peptide TRP-2 de séquence SEQ ID N° 4 est un octapeptide correspondant
5 aux acides aminés 181-188 (VYDFFVWL) de la tyrosinase-related protein 2 (TRP-2). TRP-2 est exprimée dans les mélanocytes et les mélanomes. Il a été démontré que cet antigène induit des réponses CTL protectrices du mélanome dans les souris C57BL/6 (H-2K^b) (Bloom et al., 1997, J. Exp. Med. 185, 453-459).

A : Génération de CTL anti-Melan-A et anti-TRP-2 après immunisation par rP40
10 mélangé à un peptide analogue au Melan-A ou TRP-2

Protocole expérimental

Des souris A2/Kb ont reçu par injection sous-cutanée à la base de la queue :

- 50 μ g ELA mélangés à 3 ou 300 μ g rP40 ;
- 50 μ g ELA couplés de façon covalente à 300 μ g rP40.

15 Des souris C57BL/6 ont reçu par injection sous-cutanée à la base de la queue :

- 50 μ g du peptide TRP-2 (181-188) mélangés à 300 μ g rP40.

Génération de cellules cytotoxiques effectrices

10 jours après immunisation, les souris sont sacrifiées et les lymphocytes des ganglions drainant sont récupérés pour être stimulés in vitro avec le peptide relevant.

20 Ces lymphocytes ($4 \text{ à } 5 \cdot 10^6$) sont cultivés en plaque 24 puits en DMEM plus 10 mM HEPES, 10 % SVF et 50 μ M β -2-mercaptoéthanol avec $2 \text{ à } 5 \cdot 10^5$ cellules EL-4 A2/Kb ou EL4 irradiées (10 kRads) pré-pulsées 1 h à 37°C avec 1 μ M du peptide relevant. Après deux stimulations hebdomadaires, les cellules sont testées pour leur activité cytotoxique.

25 Mesure de l'activité cytotoxique

Les cellules EL-4 A2/Kb ou EL4 sont incubées 1 h avec du ^{51}Cr en présence ou non du peptide relevant, lavées puis co-incubées avec les cellules effectrices à différents ratio en plaque 96 puits dans un volume de 200 μ l pendant 4 à 6 h à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et le relargage de ^{51}Cr est mesuré dans 100 μ l de
30 surnageant. Le pourcentage de lyse spécifique est calculé comme suit :

% lyse spécifique = (relargage expérimental-relargage spontané) / (relargage total - relargage spontané) X 100.

Résultats

Comme le montrent les figures 1A à 1D, l'immunisation de souris avec une dose optimale de rP40 (300 μ g) en mélange avec hELA (figure 1B) ou TRP-2 (figure 1D) induit une forte réponse CTL spécifique. Une telle réponse est également observée après immunisation avec rP40 couplée à hELA (figure 1C). Par contre, l'immunisation avec le peptide seul ou rP40 seule (résultats non montrés) ou avec le peptide hELA en mélange avec une dose sous-optimale de rP40 (3 μ g) n'induit aucune activité CTL (figure 1A). Ces résultats démontrent que la molécule rP40 mélangée ou couplée à des peptides immunogènes permet d'induire une réponse CTL spécifique in vivo, et ce sans l'ajout d'adjuvant.

B : Génération de CTL anti-Melan-A après immunisation par rP40 mélangé à un peptide analogue au Melan-A comparée à un protocole standard d'immunisation

Protocole expérimental

Des souris A2/Kb ont reçu :

- 50 μ l d'IFA (adjuvant incomplet de Freud) en injection sous-cutanée à la base de la queue puis 3 semaines après 50 μ g de hELA en présence de 50 μ g d'un peptide p30 T helper dérivé de Tetanus Toxoïd (TT) (Panina-Bordignon et al., Eur. J. Immunol., 1989, 19, 2237) adjuvé en IFA. Ce protocole a été décrit pour permettre de générer des CTL anti-peptides (Valmori et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24, 1458) et sert de contrôle positif.

- 50 μ g de hELA seul ou 300 μ g de rP40 mélangé ou couplé à 50 μ g hELA.

Génération de cellules cytotoxiques effectrices

10 jours après la dernière immunisation, les souris sont sacrifiées et les lymphocytes des ganglions drainant sont récupérés pour être stimulés in vitro avec le peptide relevant.

Ces lymphocytes (4 à 5 10^6) sont cultivés en plaque 24 puits en DMEM plus 10 mM HEPES, 10% SVF et 50 μ M β -2-mercaptoethanol avec 2 à 5 10^5 cellules EL-4 A2/Kb (cellules murines transfectées avec le gène HLA-A* 0201/Kb) irradiées (10 kRads) pré-pulsées 1 h à 37°C avec 1 μ M du peptide relevant.

Après une, deux ou trois stimulations hebdomadaires, les cellules sont testées pour leur activité cytotoxique.

La mesure de l'activité cytotoxique est effectuée selon la méthode décrite précédemment.

5 Résultats

Une activité CTL anti-hELA est mesurée après immunisation par rP40 couplée à hELA non adjuvé comparable à celle observée après immunisation avec hELA + P30/IFA (cf. figures 2C et 2D). De même, le mélange rP40 + peptide hELA lui aussi non adjuvé génère des CTL de manière similaire à ce qui est obtenu avec un protocole classique de génération de CTL (cf. figures 2B et 2D).

10 Aucune activité CTL n'a été détectée après immunisation avec le peptide seul (cf. figure 2A), ou la protéine rP40 seule (non montrée) indépendamment du jour de stimulation des cellules effectrices.

REVENDICATIONS

1/ Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, ou d'un de ses fragments, associée au peptide de séquence SEQ ID N° 3 ELAGIGILTV, pour la
5 préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer une réponse T cytotoxique dirigée contre des cellules de mélanome.

2/ Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, ou d'un de ses fragments, associée au peptide de séquence SEQ ID N° 3 selon la revendication 1, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la
10 prévention des mélanomes malins.

3/ Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie.

4/ Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite
15 protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

5/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

6/ Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que la séquence
20 d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une
25 séquence telle que définie en a).

7/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit peptide de séquence SEQ ID N° 3 est couplé ou mélangé avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

8/ Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit peptide
30 de séquence SEQ ID N° 3 est couplé par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

9/ Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage réalisé par synthèse chimique.

10/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit peptide de séquence SEQ ID N° 3 pour faciliter le couplage chimique.

11/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

12/ Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que la protéine hybride résultant du couplage entre ledit peptide de séquence SEQ ID N° 3 et ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est obtenue par recombinaison génétique.

13/ Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride.

14/ Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ladite construction nucléique est contenue dans un vecteur, ou dans une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine hybride.

15/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 14, pour la préparation d'une composition pharmaceutique administrable par voie sous-cutanée ou intradermique.

16/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

17/ Composition pharmaceutique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 16.

18/ Composition pharmaceutique selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comprend la protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, une protéine dont la séquence présente une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ou un fragment d'au moins 5 acides aminés de ladite protéine OmpA de séquence SEQ ID N° 2, associée par mélange ou par couplage au peptide de séquence SEQ ID N° 3.

19/ Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une construction nucléique contenant un acide nucléique codant pour la protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, une protéine dont la séquence présente une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ou un
5 fragment d'au moins 5 acides aminés de ladite protéine OmpA de séquence SEQ ID N° 2, et un acide nucléique codant pour le peptide de séquence SEQ ID N° 3.

20/ Composition selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

10 21/ Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce que ledit véhicule est un liposome, ou un vecteur viral ou une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit peptide de séquence SEQ ID N° 3.

15 22/ Composition selon l'une des revendications 17 à 21, caractérisée en ce que ladite composition est contenue dans un milieu pharmaceutiquement acceptable.

23/ Composition selon l'une des revendications 17 à 22, caractérisée en ce que ladite composition contient en outre un détergent.

24/ Composition selon l'une des revendications 17 à 23, sans autre adjuvant permettant d'induire une réponse CTL.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00394

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/00 A61K39/385 A61K48/00 A61P35/00 //C07K14/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>VALMORI D ET AL: "Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues."</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 160, no. 4, 1998, pages 1750-8, XP002139350 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 June 2000

Date of mailing of the international search report

20/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. Application No
PCT/FR 00/00394

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HAEUW JF ET AL: "The recombinant Klebsiella pneumoniae outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 255, 1998, pages 446-454, XP002114947 * page 450, left-hand column, line 26 - right-hand column, line 21 * page 452, right-hand column, line 18 - line 50</p> <p>---</p>	1-24
A	<p>RAULY I ET AL: "P40: A promising new carrier protein." RESEARCH IN IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 1, January 1998 (1998-01), page 99 XP002116543 abstract</p> <p>---</p>	1-24
T	<p>VALMORI D ET AL: "Induction of potent antitumor CTL responses by recombinant vaccinia encoding a Melan-A peptide analogue." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 164, no. 2, 2000, pages 1125-31, XP002139351 abstract</p> <p>---</p>	1-24
P,A	<p>KIM S K ET AL: "Induction of HLA class I-restricted CD8+ CTLs specific for the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis in human genital tract infections." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 162, no. 11, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 6855-66, XP002120614 abstract</p> <p>-----</p>	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Internationale No

PCT/FR 00/00394

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K39/00 A61K39/385 A61K48/00 A61P35/00 //C07K14/26

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>VALMORI D ET AL: "Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues."</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 160, no. 4, 1998, pages 1750-8, XP002139350 abrégé</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-24



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den Internationale No
PCT/FR 00/00394

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>HAEUW JF ET AL: "The recombinant Klebsiella pneumoniae outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 255, 1998, pages 446-454, XP002114947 * page 450, left-hand column, line 26 - right-hand column, line 21 * page 452, colonne de droite, ligne 18 - ligne 50</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-24
A	<p>RAULY I ET AL: "P40: A promising new carrier protein." RESEARCH IN IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 1, janvier 1998 (1998-01), page 99 XP002116543 abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-24
T	<p>VALMORI D ET AL: "Induction of potent antitumor CTL responses by recombinant vaccinia encoding a Melan-A peptide analogue." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 164, no. 2, 2000, pages 1125-31, XP002139351 abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-24
P,A	<p>KIM S K ET AL: "Induction of HLA class I-restricted CD8+ CTLs specific for the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis in human genital tract infections." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 162, no. 11, 1 juin 1999 (1999-06-01), pages 6855-66, XP002120614 abrégé</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24